

良性家族性婴儿惊厥 *KCNQ2* 基因 G271V 突变体钾通道的功能研究

惠智艳¹, 张旭¹, 孙红梅¹, 周熙惠^{2△}

1. 延安大学附属医院 重症医学科(延安 716000); 2. 西安交通大学第一附属医院 新生儿科(西安 710061)

【摘要】 目的 观察良性家族性婴儿惊厥相关基因 *KCNQ2* 突变体 G271V 的钾通道的功能,进一步探讨 *KCNQ2* 基因 G271V 突变的致病机理。方法 将前期成功构建的突变体 G271V 或和 Kv7.2 及 Kv7.3 的真核表达载体转染进真核表达细胞(HEK293 细胞),利用全细胞膜片钳技术检测 G271V 突变体的钾通道功能。结果 转染 HEK293 细胞后,G271V 突变体无电流产生,与野生型相比,激活电流明显下降,诱导电压门控去极化改变。G271V 的最大激活电流密度为(2.47±0.41) pA/pF($n=12$),Kv7.2 的最大激活电流密度为(20.53±2.51) pA/pF($n=10$),差异有统计学意义($P<0.001$)。同时,突变体可以消除同源通道的电流改变,Kv7.2/Kv7.3 的最大激活电流密度为(123.68±15.21) pA/pF($n=15$),Kv7.2/G271V/Kv7.3 的最大激活电流密度为(42.71±6.27) pA/pF($n=10$),而 G271V/Kv7.3 的最大激活电流密度为(3.74±0.76) pA/pF($n=10$),差异有统计学意义($P<0.05$),突变体引起 Kv7.2/G271V/Kv7.3 异源通道电流减少约 50%。结论 G271V 突变体不能使钾通道开放去极化钾电流,突变体引起钾通道功能缺陷。

【关键词】 癫痫 *KCNQ2* Kv7.2 电压门控钾通道 膜片钳电生理技术

The Function of Potassium Channel in *KCNQ2* G271V Mutants of Benign Familial Neonatal Convulsions HUI Zhi-yan¹, ZHANG Xu¹, SUN Hong-mei¹, ZHOU Xi-hui^{2△}. 1. Department of Critical Care Medicine, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, China; 2. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

△ Corresponding author, E-mail: zhousih@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To determine the function of potassium channel in *KCNQ2* G271V mutants of benign familial neonatal convulsions. **Methods** HEK293 cells were transfected with pcDNA3-WT-*KCNQ2* and / or pcDNA3-G271V-*KCNQ2* and pcDNA3-WT-*KCNQ3*. The potassium channel function of G271V mutants was assessed using the whole cell patch clamp technique. **Results** G271V mutants did not show currents in the transfected HEK cells, inducing large depolarizing shift of the conductance voltage relationship and slowing down the current activation kinetics. The required current density was (2.47±0.41) pA/pF ($n=12$) for the expression of G271V, and whereas (20.53±2.51) pA/pF ($n=10$, $P<0.001$) for Kv7.2. G271V mutants abolished currents in the homomeric channel. Kv7.2/Kv7.3 induced robust current was (123.68±15.21) pA/pF ($n=15$) and Kv7.2/G271V/Kv7.3 (42.71±6.27) pA/pF ($n=10$), G271V/Kv7.3 induced almost no current (3.74±0.76) pA/pF ($n=10$, $P<0.05$), resulting in about 50% reduction of currents in Kv7.2/G271V/Kv7.3 in the heteromultimeric condition. **Conclusion** The G271V channel fails to open potassium currents in response to depolarization, indicating a more severe functional defect of the Kv7 potassium channel.

【Key words】 Epilepsy *KCNQ2* Kv7.2 Voltage-gated potassium channel Patch-clamp electrophysiology

良性家族性新生儿惊厥(benign familial neonatal convulsions, BFNS)是一种常染色体显性遗传性疾病,主要由 *KCNQ2* 或 *KCNQ3* 基因突变所致,其分别编码电压门控 Kv7.2 和 Kv7.3 钾通道亚基^[1]。Kv7.2 通道各亚基之间可相互组装,形成同源性 M 通道;亦可与 Kv7.3 通道共同组装形成

异源性 M 通道,这两种通道均形成 M 电流。M 电流是一种慢激活电流,主要调节动作电位开始时神经元兴奋性阈值^[2]。Kv7.2 同源性 M 通道产生的电流幅度与背景水平接近;而 Kv7.2/Kv7.3 共同组装形成的异源性 M 通道产生的电流几乎是同源性 M 通道电流的 10 倍^[3]。*KCNQ2* 或 *KCNQ3* 突变所致疾病的发现为更好的理解新生儿惊厥的发病机理提供了方向。*KCNQ2*-G271V 突变(第 271 位甘

氨酸位置被缬氨酸替代)是前期在一个中国良性家族性婴儿惊厥(BFIC)家系中发现的新突变^[4], G271V 氨基酸突变位于孔区,这个区域在 Kv7.2 钾通道高度保守。为了解 G271V 突变的功能,前期我们将突变体瞬时转染人胚胎肾 HEK293 细胞,通过激光共聚焦显微镜及蛋白印记技术证实突变体不影响蛋白的转运及表达功能^[5],本实验利用电生理全细胞膜片钳技术进一步探讨 G271V 突变体通道的电流特性,为进一步阐明新生儿惊厥的发病机制提供一定临床依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293 细胞株由西安交通大学环境与疾病相关基因实验室提供,真核细胞表达质粒 pcDNA3.0-KCNQ2 及 pcDNA3.0-KCNQ3 为河北省医科大学药理学研究室提供,pcDNA3-G271V-KCNQ2 由西安交通大学环境与疾病相关基因实验室前期构建。脂质体 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。Axon-700B 单探头膜片钳放大器、Digi Data-1322A 数模转换装置及 pCLAMP9.2 膜片钳数据处理软件均为美国 Axon 公司产品。

1.2 HEK293 细胞的转染

转染前一天,HEK293 细胞铺在 6 孔板中,培养基为含有 10% 胎牛血清、不含抗生素的高糖 DMEM;转染时细胞密度为 60%~70%;转染程序按照脂质体 2000 试剂说明书进行。细胞分别被单独或混合(1:1)转染质粒:pcDNA3.0-WT-KCNQ2 和/或 pcDNA3-G271V-KCNQ2, 及 pcDNA 3.0-KCNQ3 和/或 pcDNA3.0-WT-KCNQ2 和/或 pcDNA3-G271V-KCNQ2。转染 24~48 h 后立即进行膜片钳实验。

1.3 全细胞膜片钳技术检测 KCNQ 钾通道电生理功能

使用全细胞膜片钳技术记录 HEK293 细胞表达电流。通过检测电流脉冲+40 mV 结束时的峰电流除以细胞电容计算得到最大激活电流密度(pA/pF)。使用 pCLAMP9.2 软件记录电流。细胞外液(mmol/L): NaCl 140, KCl 5.4, Ca 1.8, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.33, HEPES 5 和葡萄糖 5.5 (pH7.4)。电极内液(mmol/L): K-gluconate 130, MgCl₂ 1, K₂ATP 5, K₂ creatine phosphate 5, EGTA 10 和 HEPES 5 (pH7.4)。记录时玻璃微电极阻抗为 3~5 MΩ。所有实验在室温(23±2)℃

中完成。

1.4 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,曲线拟合利用 Origin 7.5 软件进行,两组间比较应用 *t* 检验,多组样本比较应用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同源或异源 Kv7.2/Kv7.3 通道的全细胞电流

细胞转染质粒 24~48 h 后记录全细胞电流,细胞钳制电压为 -70 mV,后以 10 mV 幅度逐步增加去极化电压,至 +50 mV 电压水平,维持 500 ms 时间后复极化到 -40 mV。Kv7.2 产生典型的时间电压依赖性外向钾电流,而 G271V 突变体未检测到电流(图 1A),二者激活电流的电流-电压(I-V)关系曲线显示:相同电压下,G271V 突变体比 Kv7.2 电流(从 -20 mV 开始)明显减少(图 1B)。同时,来自大脑 M 通道的异源聚体 Kv7.3 与 Kv7.2/Kv7.3 (1:1),G271V/Kv7.3 (1:1) 和 Kv7.2/G271V/Kv7.3 (0.5:0.5:1) 共转染后分别记录电流。如图 1C 所示,Kv7.2/Kv7.3 显示强的电流,而 G271V/Kv7.3 无电压依赖性门控外向钾电流显示,Kv7.2/G271V/Kv7.3 共表达也能产生电流,但电流较 Kv7.2/Kv7.3 明显下降,图 1D 显示 Kv7.2/Kv7.3、G271V/Kv7.3 和 Kv7.2/G271V/Kv7.3 通道激活电流的电流-电压关系,可以看出 Kv7.2/G271V/Kv7.3 较 Kv7.2/Kv7.3 电流下降约 50% (图中虚线是 Kv7.2/G271V/Kv7.3 电流的 50%,在电压 10~50 mV)。图 1E 显示电流的 pA/pF, G271V 的最大激活电流密度 [(2.47±0.41) pA/pF, $n=12$] 仅为 Kv7.2 最大激活电流密度 [(20.53±2.51) pA/pF, $n=10$] 的 11.7% ($P < 0.001$)。Kv7.2/Kv7.3 诱导强的最大激活电流密度为 (123.68±15.21) pA/pF ($n=15$), Kv7.2/G271V/Kv7.3 最大激活电流密度 [(42.71±6.27) pA/pF, $n=10$] 比 Kv7.2/Kv7.3 减小,而 G271V/Kv7.3 诱导几乎没有最大激活电流密度 [(3.74±0.76) pA/pF, $n=10$, $P < 0.05$]。

2.2 G271V 突变体的门控效应

观察 Kv7.2/Kv7.3 和 Kv7.2/G271V/Kv7.3 共表达时通道的门控效应,通过分析尾电流振幅绘制稳态激活曲线。结果显示,尾电流从脉冲 -40 mV 获得,去极化的前脉冲从 -70 至 +50 mV。电压依赖激活曲线通过尾电流与电压的峰值前脉冲

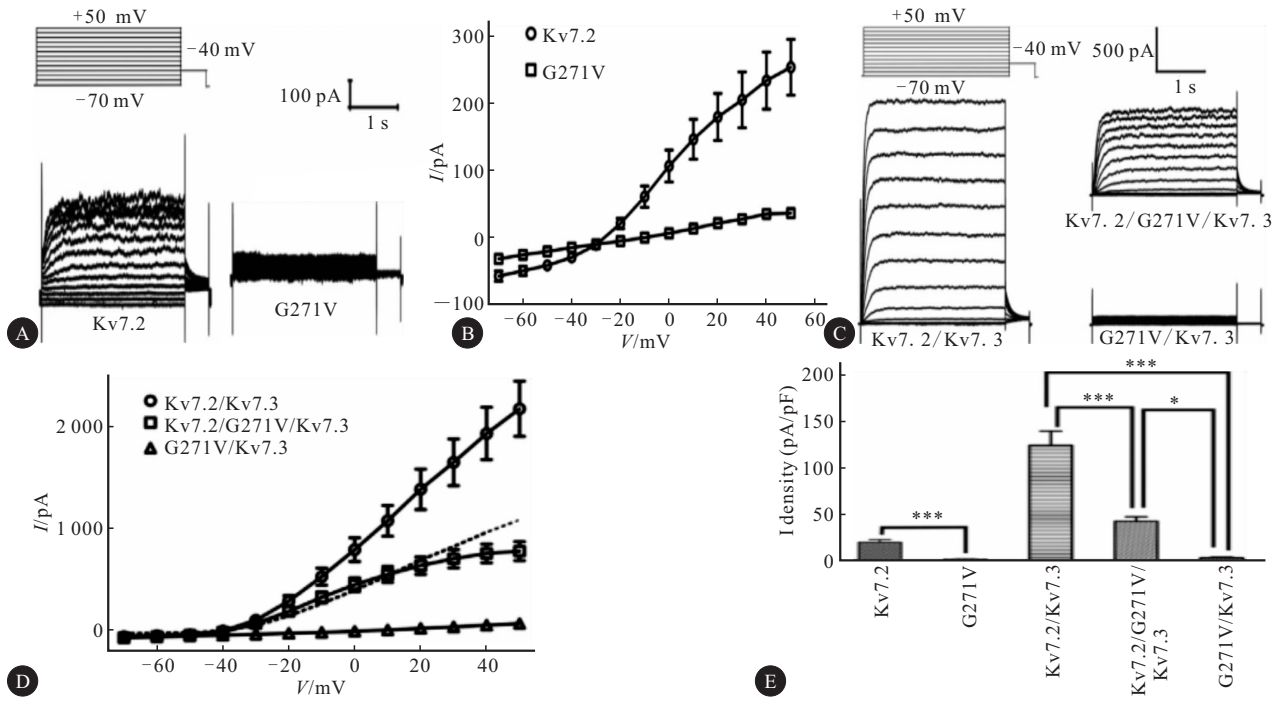


图 1 Kv7.2、G271V 和 Kv7.3 同源及异源通道蛋白在 HEK293 细胞中的电生理特性

Fig 1 Electrophysiological properties of Kv7.2, G271V and Kv7.3 homomeric and heteromeric expressed in HEK 293 cells

A,B: The raw current traces and current-voltage curve expressing of Kv7.2 and G271V; C,D: The raw current traces and current-voltage curve expressing for Kv7.2/Kv7.3, Kv7.2/G271V/Kv7.3 and G271V/Kv7.3, Imaginary line were current densities 50% of Kv7.2/G271V/Kv7.3; E: Comparison of current densities of Kv7.2, G271V, Kv7.2/Kv7.3, Kv7.2/G271V/Kv7.3 and G271V/Kv7.3 ($n=15$). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

绘制。斜率通过 Boltzmann 方程拟合。如图 2A 显示,异源通道 Kv7.2/G271V/Kv7.3 的半激活电压 (V_{half}) 和斜率因子 (k) 分别是 (-15.43 ± 1.39) mV 和 (12.07 ± 1.32) mV/e-fold, 而 Kv7.2/

Kv7.3 通道的分别是 (-18.53 ± 1.21) mV 和 (9.54 ± 1.09) mV/e-fold。二者的 V_{half} 值和 k 值比较差异并无统计学意义(每组 $n=15$, $P > 0.05$, 图 2B)。最重要的是,数据显示突变体的共表达并未

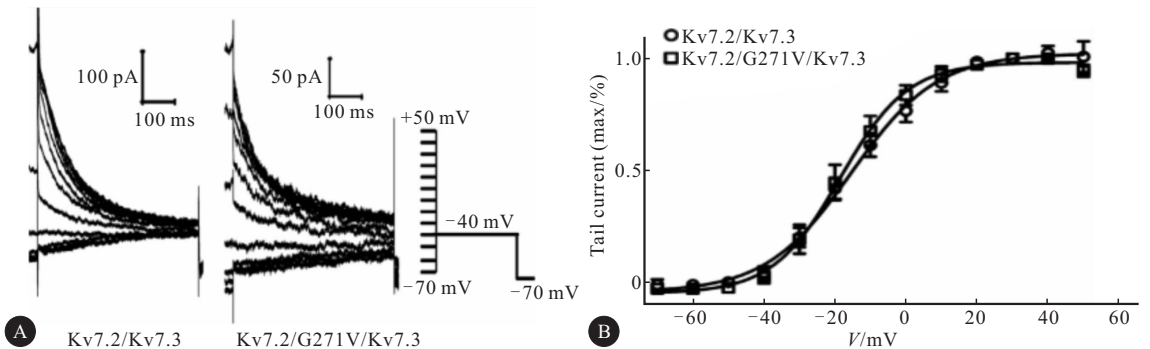


图 2 G271V 突变体和异源通道 Kv7.2/Kv7.3 的尾电流(A)和经 Boltzmann 方程拟合后曲线(B)

Fig 2 Effects of G271V on the tail currents of heterozygous heteromeric Kv7.2/Kv7.3 channels (A) and Boltzmann equation fitting curve (B)

影响 Kv7.2/Kv7.3 通道尾电流的门控效应。

图 3 显示 Kv7.2/Kv7.3 和 Kv7.2/G271V/Kv7.3 的电流激活动力学特性,可见电流测试脉冲 +50 mV 是最好的配备双指数函数,分析去极化时情况。图 3A 显示二组电流的去失活部分。将去失

活电流进行双指数方程拟合后,得出快去失活及慢去失活时间常数 (τ_{fast} , τ_{slow}) (图 3B, 3C)。Kv7.2/G271V/Kv7.3 的时间常数 τ_{fast} 和 τ_{slow} 分别为 $[(68.42 \pm 6.85)$ ms 和 (1770.21 ± 644.23) ms, $n=14$], 比 Kv7.2/Kv7.3 的时间常数 τ_{fast} 和 τ_{slow} [分

别为 (46.86 ± 4.26) ms 和 (507.31 ± 69.40) ms, $n=14$)慢($P<0.05$)。电流减速振幅(慢振幅)使用函数 $A_s/(A_s+A_f)$ 计算,其中 A_s 为快去失活电流,

A_f 为慢去失活电流。Kv7.2/G271V/Kv7.3 的慢振幅为 0.29 ± 0.05 ($n=12$),大于 Kv7.2/Kv7.3 的慢振幅 0.13 ± 0.02 ($n=12, P<0.01$) (图 3D)。

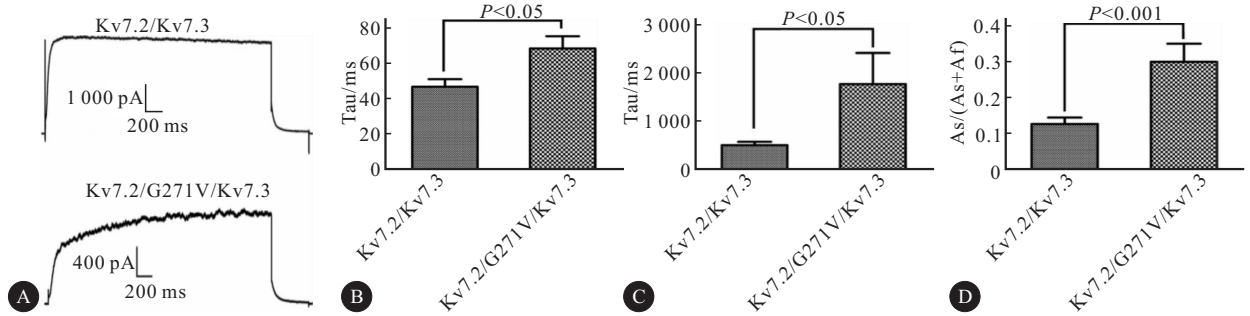


图3 Kv7.2/Kv7.3 和 Kv7.2/G271V/Kv7.3 电流激活动力学特性

Fig 3 Current activation kinetics of Kv7.2/Kv7.3 and Kv7.2/G271V/Kv7.3 channels

A: The normalized current traces; B: The fast time constants (τ_{fast}); C: The slow time constants (τ_{slow}); D: The relative contribution [$A_s/(A_s+A_f)$]

3 讨论

KCNQ2 基因 G271V 突变是我们之前在一个中国四代家庭有 17 个患病成员的 BFNS 家系中发现的一个新错义突变 (G271V)。KCNQ2 和 KCNQ3 基因主要在大脑中表达,主要编码电压门控钾离子通道亚基的 M 电流。M 电流与维持膜电位稳定和细胞兴奋性关系密切,主要使去极化时间延长,放慢激活和非激活电流,使电流复极化回到静息膜电位,限制重复放电^[2]。许多 KCNQ2 和 KCNQ3 突变与新生儿癫痫发作有关,甚至出现严重的癫痫性脑病。到目前为止,其中绝大多数影响的是 KCNQ2 (Kv7.2 通道),大多数出现在孔区及 C-端区域,包括断裂、剪切缺失,或错义突变、无义突变、框移突变等^[6-8]。G271V 是一错义突变,位于高度保守的孔区,是 KV7.2 钾通道的第 271 位甘氨酸位置被缬氨酸取代。本研究前期发现 G271V 突变并不影响 Kv7.2 通道的转运及表达^[5]。本实验利用膜片钳技术检测 G271V 突变体及与同源和/或异源聚体 Kv7.3 共表达时的电流特性,结果显示突变体并无电流产生,且与野生型相比,激活电流下降,诱导电压门控去极化改变;同时,突变体可以消除同源通道的电流改变,将突变体与 Kv7.2 与 Kv7.3 按 0.5 : 0.5 : 1 共表达时引起 Kv7.2/G271V/Kv7.3 异源通道电流减少约 50%,突变体显示出负显性效应;且突变体的共表达并未影响 Kv7.2/Kv7.3 通道尾电流的门控效应,但慢振幅的改变说明其降低了 Kv7 通道的电流激活属性。

到目前为止,大部分 KCNQ2 突变通过电生理技术检测均引起同源突变体通道钾电流的显著减少,但将突变体和 Kv7.2 与 Kv7.3 按 1 : 1 : 2 比例共表达时导致减少的最大电流为 20%~25%^[9-11]。携带 KCNQ2 突变的患者与早发性癫痫有关,具有表型异质性,从 BNFS 至认知障碍、癫痫脑病及药物抵抗等^[12]。基因型决定表型,突变体功能缺失是否影响表型取决于基因产物的残留水平,功能减少可能加重表型^[13]。相比之下,大多数 Kv7.2 异聚体突变体电流减少不到 25%,而 G271V 异聚体的相对电流减少了约 50%,意味着这个不寻常的 G271V 功能障碍可能会导致更严重的表型。周熙惠等^[4]报道两个携带 G271V 成员终身有癫痫发作和阵发性肌纤维颤搐 (peripheral nerve hyperexcitability, PNH),其中一个患者有严重的精神发育迟滞,且无语言及社会能力。G271V 突变体的两个患者的临床症状与 BFNS 相关的新生儿癫痫症状类似,但癫痫发作也有显著差异,可能存在遗传共分离现象,在这个家系不能完全排除遗传因素所致的智力障碍和肌纤维颤搐,也可能与其它如基因变异、表观遗传学或环境因素等有关。关于表型-基因型之间是否相关仍需要更多的研究,为提高改善预后的预测和早期识别遗传咨询奠定基础。

值得注意的是,与 G271V 相同的突变位点,在一个 BFNS 家系 Kv7.3 通道相关蛋白的孔区也被发现 (G310V)^[14],其在蟾蜍卵母细胞中表达, KCNQ3-G310V/WT-KCNQ3/WT-KCNQ2 与 WT-KCNQ3/WT-KCNQ2 相比电流仅减少 20%,认为无

负显性效应。在 Kv7.1 通道相同位置的甘氨酸突变(G306R),在 LQT1 患者中发现,突变体参与了长 QT 综合征(LQTS)的发病机理,在杂合表达中亦显示出通道的功能改变,即电流的显著减少^[15]。而在一个日本 BFNS 家系中发现 Kv7.3 W309R 突变,与 G310V 相邻,研究发现突变体亦无电流产生,与异源通道 Kv7.2 在体外共表达时电流减少幅度 50%以上,亦具有明显的负显性效应^[16]。在一个有 PNH 和 BNFS 家系中发现的 Kv7.2 孔区突变 R207W 功能研究显示突变体电流-电压去极化的转移,与野生型共表达后电流减少了 70%以上,具有负显性效应^[17]。另一个 BFNC 家系 Kv7.2 孔区的突变 Y284C 功能分析电流减少了 20%~30%^[18]。这些研究表明,与疾病相关的 Kv7 突变的孔区,可能具有特定的功能,如引起部分或明显的负显性效应。

总之,本实验研究了与人类癫痫相关的 G271V 突变体的发病机制。这一错义突变,影响孔区第一个 G 氨基酸残基,引起同源通道 Kv7.2 电流的缺失,导致双杂合体的电流减少 50%,具有明显的负显性效应。我们的数据表明 G271V 突变引起了通道功能的明显缺陷,可能引起更严重的表型。这些结果表明,G271V 突变体位于孔螺旋区域对正常钾通道孔区的功能至关重要。虽然研究发现,因 Kv7.2 或 Kv7.3 所致突变导致 M 电流的减少,但 Kv7 相关的癫痫的发病机理至今未完全阐明。关于确定新的突变及这些突变体功能仍需进一步研究,这对更好的理解癫痫的发病机制和开发新的抗癫痫药物至关重要。

参 考 文 献

- [1] MALJEVIC S, WUTTKE TV, SEEBOHM G, *et al.* KV7 channelopathies. *Pflugers Arch*,2010,460(2):277-288.
- [2] COOPER EC, JAN LY. M-channels: neurological diseases, neuromodulation, and drug development. *Arch Neurol*,2003,60(4):496-500.
- [3] SINGH NA, OTTO JF, DAHLE EJ, *et al.* Mouse models of human KCNQ2, and KCNQ3, mutations for benign familial neonatal convulsions show seizures and neuronal plasticity without synaptic reorganization. *J Physiol*,2008,586(14):3405-3423.
- [4] 周熙惠, 马爱群, 刘小红, 等. 良性家族性婴儿惊厥家系 KCNQ2 基因新突变. *中华儿科杂志*,2006,44(7):487-491.
- [5] 周熙惠, 惠智艳, 史瑞明, 等. 新生儿惊厥相关基因 KCNQ2 定点突变及其蛋白表达的研究. *中国当代儿科杂志*,2011,13(8):611-616.
- [6] MALJEVIC S, LERCHE H. Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Prog Brain Res*,2014,213:17-53[2018-01-05]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63326-2.00002-8>.
- [7] WECKHUYSEN S, MANDELSTAM S, SULTS A, *et al.* KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Arch Neurol*,2012,71(1):15-25.
- [8] WECKHUYSEN S, IVANOVIC V, HENDRICKX R, *et al.* Extending the KCNQ2 encephalopathy spectrum: clinical and neuroimaging findings in 17 patients. *Neurology*,2013,81(19):1697-703.
- [9] MALJEVIC S, NAROS G, YALÇIN Ö, *et al.* Temperature and pharmacological rescue of a folding-defective, dominant-negative KV 7.2 mutation associated with neonatal seizures. *Hum Mutat*,2011,32(10):E2283-E2293 [2018-01-05]. <https://doi.org/10.1002/humu.21554>.
- [10] SCHROEDER BC, KUBISCH C, STEIN V, *et al.* Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*,1998,396(6712):687-690.
- [11] SOLDOVIERI MV, CASTALDO P, IODICE L, *et al.* Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a KCNQ2 C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions. *J Biol Chem*,2006,281(1):418-428.
- [12] ORHAN G, BOCK M, SCHEPERS D, *et al.* Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*,2014,75(3):382-394.
- [13] SOLDOVIERI MV, MICELI F, BELLINI G, *et al.* Correlating the clinical and genetic features of benign familial neonatal seizures (BFNS) with the functional consequences of underlying mutations. *Channels*,2007,1(4):228-233.
- [14] CHARLIER C, SINGH NA, RYAN SG, *et al.* A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet*,1998,18(1):53-55.
- [15] GUISCARD S, MICHAEL P, SANGUINETTI MC. Pharmacological activation of normal and arrhythmia-associated mutant KCNQ1 potassium channels. *Circ Res*,2003,93(10):941-947.
- [16] SUGIURA Y, NAKATSU F, HIROYASU K, *et al.* Lack of potassium current in W309R mutant KCNQ3 channel causing benign familial neonatal convulsions (BFNC). *Epilepsy Res*,2009,84(1):82-85.
- [17] DEDEK K, KUNATH B, KANANURA C, *et al.* Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2001,98(21):12272-12277.
- [18] WUTTKE TV, JURKAT-ROTT K, PAULUS W, *et al.* Peripheral nerve hyperexcitability due to dominant-negative KCNQ2 mutations. *Neurology*,2007,69(22):2045-2053.
(2018-05-15 收稿,2018-07-28 修回)

编辑 沈 进